

PCT/EP 2004/007000

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EPO-BERLIN

04-08-2004

| | |
|-------------|-----|
| RECEIVED | |
| 18 MAR 2004 | |
| WIPO | PCT |

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 31 107.6

Anmeldetag: 4. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: Epigenomics AG, 10435 Berlin/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis von Cytosin-
Methylierungen in DNA mittels Cytidin-Deaminasen

IPC: C 12 Q 1/68

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA mittels Cytidin-Deaminasen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-Sequenzen. Dabei wird die zu untersuchende DNA mit einer Cytidin-Deaminase umgesetzt, die Cytidin schneller als 5-Methylcytidin deaminiert. Durch die Umwandlung wird Cytosin in Uracil umwandelt, während 5-Methylcytosin im wesentlichen unverändert bleibt. Die enzymatisch vorbehandelte DNA wird bevorzugt amplifiziert und kann dann über unterschiedlichen Methoden analysiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen und anderer mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierter Krankheiten sowie zur Prognose unerwünschter Arzneimittelwirkungen.

Hintergrund der Erfindung

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek, eds.: The Epigenome. Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff).

Die konventionellen Verfahren leiden unter mehreren Nachteilen. Die Behandlung mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen ist durch die Sequenzspezifität der Enzyme auf bestimmte Sequenzen beschränkt. Die Bisulfitbehandlung ist zeit- und arbeitsaufwendig. Es sind Reaktionszeiten von über vier Stunden erforderlich, um eine vollständige Umwandlung zu erreichen. Dabei wird die DNA allerdings zum größten Teil abgebaut. So wird der Anteil der degradierten DNA auf zwischen 84 % und 96 % beziffert (vgl.: Grunau et al.: Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res. 2001 Jul 1;29(13)). Durch diese hohe Abbaurate ist es schwierig, die Bisulfitumwandlung für Untersuchungen einzusetzen, in denen die zu untersuchende DNA limitiert ist. Ein besonders interessantes Anwendungsgebiet der Methylierungsanalyse liegt jedoch gerade darin, über DNA aus Körperflüssigkeiten, etwa aus Blut oder Urin, Krebserkrankungen oder andere mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierte Krankheiten zu diagnostizieren. In Körperflüssigkeiten kommt die DNA jedoch nur in geringen Konzentrationen vor, so dass der Einsatz der herkömmliche Bisulfitbehandlung mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Aufgrund der besonderen biologischen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der erwähnten Nachteile der herkömmlichen Methodik besteht ein großes technisches Bedürfnis an verbesserten und vereinfachten Verfahren zur Methylierungsanalyse. Im folgenden ist ein solches Verfahren beschrieben. Die hier offenbarte Erfindung basiert auf dem Einsatz von Cytidin-Deaminasen, die Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell umsetzen. Insbesondere handelt es sich hierbei um die *Aktivierungs-induzierten Cytidin-Deaminase* (*activation-induced cytidine deaminase* - AID). Dieses Enzym ist in der Lage, nicht-methyliertes Cytosin in Uracil umzuwandeln, während methyliertes Cytosin im wesentlichen unverändert bleibt. Im Fall einer vollständigen Umwandlung entsteht also eine DNA-Sequenz, in der alle noch vorhandenen Cytosine methyliert sind, während die ursprünglich unmethylierten Cytosine nun als Uracile vorliegen. Das Ergebnis der enzymatischen Umsetzung entspricht demnach dem der chemischen Vorbehandlung mit Bisulfit. Das enzymatische Verfahren ist allerdings schneller und schonender als das chemische Verfahren. Der Nachweis der Cytosine in der enzymatisch vorbehandelten DNA kann über die herkömmliche molekularbiologische Methodik erfolgen. Es können insbesondere dieselben Verfahren wie zur Analyse chemisch-vorbehandelter DNA verwendet werden, etwa unter Einsatz von Polymerasereaktionen. Dabei liegt ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, dass die Anwendung der Nachweisverfahren ohne eine arbeitsaufwendige Aufreinigung der DNA möglich ist. Eine solche ist bei der chemisch vorbehandelten DNA zur Entfernung des Bisulfits erforderlich.

Biologisch spielt das AID-Enzym eine wichtige Rolle bei der Antikörper-Diversifizierung in B-Zellen. Es ist insbesondere an der *somatischen Hypermutation* (*somatic hypermutation*, SHM), an der *Genkonversion* (*gene conversion*)

und an der *Klassen-Wechsel-Rekombination* (*class switch recombination, CSR*) beteiligt (zur Übersicht: Storb and Stavnezer: Immunoglobulin Genes: generating Diversity with AID and UNG. Curr Biol. 2002 Oct 29;12(21):R725-7).

5
Erforderlich für die AID-Aktivität ist einzelsträngige
DNA. Die AID ist nicht in der Lage, intakte doppelsträngige
DNA umzusetzen. Allerdings kann eine Cytosin-
Deaminierung in einzelsträngigen Bereichen doppelsträngiger
10 DNA erfolgen. So kann die AID doppelsträngige DNA, die gerade transkribiert wird, umsetzen. Dabei erfolgt die Deaminierung im Nicht-Templat-Strang, der während der Transkription exponiert ist (Chaudhuri et al., Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. Nature. 2003 Apr 17;422(6933):726-30; Ramiro et al., Transcription enhances AID-mediated
15 cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the non-template strand. Nat Immunol. 2003 May;4 (5):452-6). Bei einzelsträngiger DNA kann innerhalb von 15 Minuten eine nahezu 100%ige Umwandlung von Cytosin in Uracil
20 erreicht werden. Dabei ist die Aktivität der AID in doppelsträngiger DNA mit partiell nicht komplementären Sequenzen zum Teil deutlich höher als bei einzelsträngiger DNA. Dies gilt insbesondere für nicht komplementäre Bereiche mit einer Größe zwischen fünf bis neun Nukleotiden
25 (Bransteitter et al a.a.o. 2003, S. 4105 Fig 4a, S. 4106 Tab 1). Die Spezifität der AID für Cytosin ist etwa 10-fach höher als die für 5-Methylcytosin (Bransteitter et al a.a.o. 2003, S. 4105 Fig 4b, S. 4106). Eine technische
30 Anwendung dieser Eigenschaften des AID-Enzyms ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. In der US-Patentanmeldung US 20020164743 (= EP 1174509) sind u.a. Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der AID offenbart. Eine Anwendbarkeit des Enzyms zur Untersuchung von Cytosinmethylierungen ist jedoch auch hier nicht erwähnt. Das
35 erfindungsgemäße Verfahren verschafft daher der Methylierung

rungsanalyse zum erstem Mal Zugang zu dem AID-Enzym. Aufgrund der besonderen biologischen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der Nachteile der bekannten Verfahren stellt das Eröffnen dieser neuen Technologie einen wichtigen technischen Fortschritt dar.

Beschreibung

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt einen Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA. Dabei wird die zu untersuchende DNA mit dem einer Cytidin-Deaminase in Kontakt gebracht, wobei die Cytidin-Deaminase Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell deaminiert. Die partiell deaminierte DNA wird dann hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht. Anschließend wird aus dem Vorliegen oder dem Anteil deaminierter Positionen auf den Methylierungszustand der zu untersuchten DNA geschlossen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Enzym Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID) verwandt. Soweit verfügbar, können aber auch andere Cytidin-Deaminasen eingesetzt werden, die Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedliche schnell umsetzen. Das AID-Enzym ist über verschiedene Wege erhältlich. So ist in der Literatur etwa die Expression des Enzyms in Insektenzellen beschrieben. Das auf diese Weise gewonnene Enzym muss allerdings vor dem Einsatz mit einer RNase umgesetzt werden, um einen RNA-Inhibitor zu entfernen (Brandsteitter et al. 2003, a.a.o). Auch die Expression der AID in E.coli ist bekannt. Eine RNase-Behandlung ist hier nicht erforderlich (Sohail, et al. 2003, a.a.o). Ebenfalls beschrieben ist eine Isolierung der AID aus stimulierten, murinen B-Zellen (Chaudhuri et al., 2003, a.a.o). Dem Fachmann sind weitere Möglichkeiten bekannt, Proteine herzustellen und zu isolieren. Neben humaner AID sind für das erfindungsgemäße Verfahren auch Enzyme aus anderen Quellen einsetzbar, insbesondere aus Säugetieren, etwa

aus Rindern, Schweinen, Schafen, Mäuse etc.. Es ist nahe-
liegend, dass auch biologisch aktive Fragemente sowie Mo-
difikationen des Enzyms, etwa thermostabile Varianten,
für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden kön-
nen.

Die zu untersuchende DNA kann aus unterschiedlichen Quel-
len stammen. Für diagnostische Fragestellungen können als
Ausgangsmaterial u.a. Gewebeproben, aber auch Körperflüs-
sigkeiten, insbesondere Serum, dienen. Denkbar ist auch,
die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-
Flüssigkeit zu verwenden. Bevorzugt wird die DNA aus den
biologischen Proben isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt
nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des
Qiagen UltraSens DNA Extraktions-Kits. Die isolierte DNA
kann dann z.B. durch Umsatz mit Restriktionsenzymen frag-
mentiert werden. Die Reaktionsbedingungen und die in Fra-
ge kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben
sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Pro-
tokollen.

Die zu untersuchende DNA muss für den Umsatz mit der AID
zumindest partiell einzelsträngig vorliegen. Dem Fachmann
sind unterschiedliche Wege bekannt, zu einzelsträngiger
DNA zu gelangen. In einer bevorzugten Variante wird die
zu untersuchende DNA hitze-denaturiert und anschließend
mit Oligonukleotiden hybridisiert, die partiell komple-
mentär zu der zu untersuchenden DNA sind. Dabei sind die
Oligonukleotide gerade zu den zu untersuchenden Cytosin-
positionen nicht komplementär, so dass in diesen Berei-
chen einzelsträngige „Blasen“ gebildet werden, an denen
die AID aktiv werden kann. Die nicht komplementären Be-
reiche sind dabei bevorzugt zwischen 3 und 20 Nukleotide,
besonders bevorzugt zwischen 5 und 12 Nukleotide und ganz
besonders bevorzugt 9 Nukleotide lang (vgl.: Brandsteit-
ter et al., 2003 S. 4106, Tab.1). In einer bevorzugten

Ausführungsform werden synthetische Oligonukleotide eingesetzt. Diese haben bevorzugt eine Länge zwischen 20 und 150, besonders bevorzugt zwischen 35 und 60 Nukleotiden. Diese Oligonukleotide werden in einem Überschuss zu der zu untersuchenden DNA eingesetzt, so dass gewährleistet ist, dass möglichst viel der zu untersuchende Cytosin-Positionen für die Deaminase zugänglich sind. Bevorzugt ist dabei eine Konzentration von 1 pM bis 1000 nM, besonders bevorzugt ein Bereich zwischen 1 nM und 100 nM. Im einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren werden mehrere Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz eingesetzt, so dass gleichzeitig eine Untersuchung mehrere Cytosinpositionen möglich ist. In einer weiteren bevorzugten Variante sind die Oligonukleotide so aufgebaut, dass sie selbst nicht von dem AID-Enzym umgesetzt werden können. Dies kann etwa dadurch geschehen, dass in den Oligonukleotiden 5-Methylcytosine statt Cytosine enthalten sind. Dem Fachmann ist bekannt, dass statt Oligonukleotiden auch andere Oligomere eingesetzt werden können, etwa Peptid-Nukleinsäure-(PNA)-Oligomere. Die Synthese der Oligomere sowie die Hybrisierungsbedingungen gehören zum Stand der Technik. Es ist naheliegend, dass für das erfindungsgemäße Verfahren statt chemisch synthetisierter Oligonukleotide auch Oligonukleotide anderen Ursprungs, etwa PCR-Fragmente oder genomische DNA eingesetzt werden können.

Reaktionsbedingungen für die Deaminierung sind in der Literatur beschrieben (siehe etwa: Brandsteitter et al. 2003, a.a.o.; Sohail et al. 2003, a.a.o.; Chaudhuri et al. 2003, a.a.o.).

Die umgewandelte DNA kann anhand der gängigen molekularbiologischen Verfahren analysiert werden, etwa über Hybridisierung oder Sequenzierung. In einer bevorzugten Variante wird die umgewandelte DNA zunächst amplifiziert.

Hierzu sind dem Fachmann unterschiedliche Verfahren bekannt, etwa Ligasekettenreaktionen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DNA allerdings über eine Polymerasereaktion amplifiziert. Hierzu sind verschiedene Ausgestaltungen denkbar, etwa die Verwendung isothermer Amplifikationsverfahren. Besonders bevorzugt sind allerdings Polymerasekettenreaktionen (PCR). In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die PCR unter Verwendung von Primern, die spezifisch nur an Positionen der umgewandelten Sequenz binden, die vorher entweder methyliert (oder bei umgekehrtem Ansatz: unmethyliert) waren. Dieses Verfahren ist bei bisulfitierter DNA unter dem Namen methylierungssensitive PCR bekannt (MSP). Dabei werden Primer verwendet, die mindestens ein 5'-CpG-3'-Dinukleotid enthalten; bevorzugt sind Primer, die mindestens drei 5'-CpG-3'-Positionen tragen, von denen mindestens eine am 3' Ende lokalisiert ist. Für die Amplifikation der unmethylierten Sequenzen bzw. der Gegenstränge sind dementsprechend 5'-TG-3' oder 5'-CA-3'-Dinukleotide erforderlich (Vgl.: Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6).

Eine andere ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist für Bisulfit-vorbehandelte DNA unter dem Namen „Heavy-Methyl“-Methode bekannt. Dabei wird eine spezifische Amplifizierung nur der ursprünglich methylierten (bzw. unmethylierten) DNA durch Einsatz mindestens eines methylierungsspezifischen Blocker-Oligomers erreicht. Der Blocker bindet an ein 5'-CG-3' (bzw. 5'-TG-3'-Dinukleotid oder 5'-CA-3')-Dinukleotid und verhindert so die Amplifikation der Hintergrund-DNA. Die Ausführungsform kann über die Auswahl der Polymerase oder über die Modifikation der Blockeroligomere so ausgestaltet sein, dass ein Abbau o-

der eine Verlängerung der Blocker minimiert wird (zur Übersicht: WO 02/072880).

5 Für den Fall, dass die erforderliche Bildung der einzelsträngigen DNA über den Einsatz partiell komplementärer Oligomere erreicht wird (s.o.), ergeben sich für die o.g. „MSP“- und „Heavy-Methyl“-Varianten weitere bevorzugte Ausführungsformen. Dabei wird zur PCR-Amplifikation mindestens ein Primer eingesetzt, der am 5'-Bereich die
10 genomische Sequenz trägt (entspricht dem doppelsträngigen, und daher nicht umgewandelten Teil der zu untersuchenden DNA), und der in seinem 3'-Bereich über eine Sequenz verfügt, die der umgewandelten DNA entspricht. In der MSP-Variante trägt der 3'-Bereich zusätzlich methylierungsspezifische Positionen.
15

Die Detektion der Amplifikate kann über herkömmliche Verfahren erfolgen, etwa über Methoden der Längenmessung wie Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese und Chromatographie (z.B. HPLC). Auch Massenspektrometrie und Methoden zur Sequenzierung wie die Sanger-Methode, die Maxam-Gilbert-Methode und Sequencing by Hybridisation (SBH) können verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate durch Primer-Extension-Verfahren nachgewiesen (siehe etwa: Gonzalgo & Jones: Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun
20 15;25(12):2529-31; DE 100 10 282; DE 100 10 280).
30

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die die Amplifikate mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays analysiert (ein Überblick über Array-Technologie befindet sich in der Extraausgabe von: *Nature Genetics Supplement*,

Volume 21, January 1999). Auf einem solchen Array können die verschiedenen Oligomere auf einer Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sein. Die Festphasenoberfläche ist bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold zusammengesetzt. Jedoch sind auch Nitrocellulose und Kunststoffe wie Nylon, die in Form von Pellets oder auch als Harz-Matrizes existieren können, möglich. Die etwa fluoreszenzmarkierten Amplifikate werden an die gebundenen Oligomere hybridisiert und die nicht gebundenen Fragmente entfernt. Vorteilhaft ist es dabei, wenn die Oligomere über einen 12-22 Basen langen Abschnitt an die zu analysierende DNA hybridisieren und sie mindestens ein CG, TG oder CA Dinukleotid umfassen. Die Fluoreszenz-Signale können gescannt und mit Software-Programmen verarbeitet werden (Siehe etwa: Adorjan et al., Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1;30(5):e21).

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate unter Verwendung von PCR-Real-Time-Varianten analysiert (vgl.: Heid et al.: Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94, US Patent No. 6,331,393 „Methyl-Light“). Dabei wird die Amplifikation in Gegenwart eines fluoreszenzmarkierten Reporteroligonukleotid durchgeführt, das an ein 5'-CG-3'-Dinukleotid (bzw. 5'-TG-3'- oder 5'-CA-3'-Dinukleotid) hybridisiert. Das Reporteroligonukleotid bindet dabei bevorzugt an die zu untersuchende DNA und zeigt deren Amplifikation durch Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz an. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Fluores-

zenzveränderung direkt zur Analyse benutzt wird und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand geschlossen wird. Eine besonders bevorzugte Variante ist dabei das „Taqman“-Verfahren. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein zusätzliches fluoreszenzmarkiertes Oligomer verwendet, das in unmittelbarer Nähe zu dem ersten Reporteroligonukleotid hybridisiert und sich diese Hybridisierung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachweisen läßt („Lightcycler“-Verfahren).

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist es, mehrere Fragmente gleichzeitig mittels einer Multiplex-PCR zu amplifizieren. Bei deren Design muss darauf geachtet werden, dass nicht nur die Primer, sondern auch die weiteren eingesetzten Oligonukleotide nicht zueinander komplementär sein dürfen, so dass eine hochgradige Multiplexierung in diesem Fall schwieriger ist als in üblich. Jedoch hat man bei der enzymatisch vorbehandelten DNA den Vorteil, dass aufgrund des unterschiedlichen G und C-Gehaltes der beiden DNA-Stränge ein Forward-Primer niemals auch als Reverse-Primer fungieren kann, was die Multiplexierung wiederum erleichtert und den oben beschriebenen Nachteil im wesentlichen ausgleicht. Die Detektion der Amplifikate ist wiederum über unterschiedliche Verfahren möglich. Denkbar ist dabei etwa die Verwendung von Real-Time-Varianten. Für Amplifikationen von mehr als vier Genen empfiehlt es sich aber, die Amplifikate auf andere Weise zu detektieren. Bevorzugt ist dabei eine Analyse über Arrays (s.o.).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform erfolgt nach der Amplifizierung eine erneute enzymatische Umwandlung mit der AID. Hierdurch werden auch die nach der ersten Deaminierung verbleibenden Cytosine umgewandelt. Eine sol-

che wiederholte Umwandlung hat mehrere Vorteile und ist für die Bisulfitierung bereits beschrieben (vgl.: DE 100 50 942).

5 Im übrigen wird noch einmal betont, dass das Ergebnis der
erfindungsgemäßen enzymatischen Umwandlung dem Ergebnis
der Bisulfit-Behandlung entspricht. Es ist daher nahelie-
gend, dass alle bereits bekannten Verfahren zur Analyse
10 der bisulfitierten DNA auch zur Analyse der erfindungsge-
mäß umgewandelten DNA verwendet werden können. Der Fach-
mann findet Angaben über die entsprechenden Verfahren in
der wissenschaftlichen Veröffentlichungen und in der Pa-
tentliteratur. Eine aktuelle Übersicht über die mögliche
15 Methoden findet sich in: Fraga and Esteller: DNA Methyla-
tion: A Profile of Methods and Applications. Biotechni-
ques 33:632-649 (September 2002).

Eine besonders bevorzugte Verwendung des erfindungsgemä-
Ben Verfahrens liegt in der Diagnose von Krebserkrankun-
20 gen oder anderen mit einer Veränderung des Methylier-
ungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a.
CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltens-
störungen; klinische, psychologische und soziale Konse-
quenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen
35 und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte
Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und
Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des
gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder
Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, In-
30 fektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion,
Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im
Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krank-
heit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der
Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädi-
35 gung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehl-
funktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich au-

Berdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

- 5 Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung von Cytidin-Deaminasen, die Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell umsetzen, insbesondere die Verwendung der Aktivierungs-induzierten Cytidin-Deaminase (AID), eines biologisch aktiven Fragmentes der AID bzw. einer Modifikation hiervon zur Methylierungsanalyse, insbesondere zur
10 Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Unterscheidung von Zelltypen und Geweben oder
15 zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

- Erfindungsgemäß ist schließlich auch ein Kit, der aus dem AID-Enzym, eines biologisch aktiven Fragmentes der AID oder einer Modifikation hiervon sowie Oligomeren und den
20 für die Deaminierung erforderlichen Puffern besteht, sowie optional auch eine Polymerase, Primer und Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält.

Beispiel

Nachweis der CpG Methylierung im Exon 1 vom Homo sapiens p16-INK4 (p16) Gen in humaner DNA (Promega).

- 5 Die folgende Sequenz aus dem p16-INK4-Gen soll auf ihren Methylierungsstatus untersucht werden:

```

1 gaagaaagag gaggggctgg ctggtcacca gaggtgggg cggaccgct gcgctcggcg
61 gctgcggaga gggggagagc aggcagcggg cggcggggag cagcatggag ccggcggcgg
121 ggagcagcat ggagccttcg gctgactggc tggccacggc cgcggcccg ggctcgggtag
10 181 aggaggtgcg ggcgctgctg gaggcggggg cgctgcccac cgcaccgaat agttacggtc
241 ggaggccgat ccaggtgggt agagggctcg cagcgggagc aggggatggc gggcgactct
301 ggaggacgaa gtttcaggg gaattggaat caggtagcgc (Seq ID 1)

```

- 15 Dazu werden 160 ng der zu untersuchenden DNA (als Kontrolle 160 ng künstlich aufmethylierter genomischer DNA, Promega) und jeweils 25 pM von den beiden Oligonukleotiden:

```

5'-ctccaccccgctgcgctgcgctcccgccgacgcctctc-3' (Seq ID 2) und
5'-gccgactgaccgaccccacggccgcccgggccccagccca-3' (Seq ID 3)

```

- 20 in einem Reaktionsgefäß mit 20 µl Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT) für 5 min bei 96°C denaturiert und danach zum Abkühlen für 2 min auf Eis gegeben. Dabei hybridisieren die Oligonukleotide an die genomische DNA mit jeweils einer 10 bp weiten Öffnung, die ein optimales Substrat für die nachfolgende Behandlung mit dem
- 35 AID-Enzym bilden. Dazu werden dem abgekühltem Reaktionsgemisch 400 µg AID und 2 µg RNaseA (Bransteitter et. al., PNAS, v. 100, p. 4102 (2003)) zugesetzt, und das Gemisch wird für 7 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird
- 30 durch eine Phenol/Chloroform/Isoamyl (25:24:1) Fällung abgebrochen. Die Detektion wird mit einer PCR durchgeführt. Dazu werden 2 µl der gefällten DNA Lösung in 18 µl Wasser mit 2 µl Primerlösung mit jeweils 25 pM von zwei Oligonukleotiden (5'-cgctggcgacgcaaaa-3' (Seq ID 4), 5'-
- 35 ttacggtcggggcccgggctc-3' (Seq ID 5)) und 2,5 µl dNTP-Mix (Fermentas, Konzentration je dNTP 2,5 µmol/µl), 0,3 µl

Hot Star Taq (Qiagen), 2,5 µl 10x PCR Buffer Solution (Qiagen, 15 mMol MgCl₂ im Puffer enthalten) in einem Reaktionsgefäß gemischt und auf einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

5

1. 95°C 15min
2. 95°C 1min
3. 55°C 45sec
4. 72°C 1min 15sec
5. go to 2. Rep 39
6. 72°C 10min
7. Hold 10°C.

10

15

Die Kontrolle der PCR erfolgt mittels Gelelektrophorese. Dazu werden 5 µl PCR-Produkt mit 3 µl Loading Dye auf ein 1,4 % iges Agarosegel (Eurogentec., Inc.) aufgetragen. Als Laufpuffer dient 1x TBE. Die Fragmente werden mittels Ethidiumbromid angefärbt und das Gel wird unter UV-Beleuchtung abfotografiert.

20

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosinmethylierungen in DNA, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - a) die zu untersuchende DNA mit einer Cytidin-Deaminase in Kontakt bringt, wobei die Cytidin-Deaminase Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell deaminiert,
 - b) die partiell deaminierte DNA hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht, und
 - c) aus dem Vorliegen oder dem Anteil deaminierter Positionen auf den Methylierungszustand der zu untersuchenden DNA in besagten Positionen schließt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als methylierungsspezifische Cytidin-Deaminase die *Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID)* oder ein biologisch aktives Fragment der AID bzw. eine Modifikation hiervon verwendet.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende DNA in zumindest partiell einzelsträngiger Form vorliegt.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die zu untersuchende DNA mit Oligomeren hybridisiert, wobei die Hybride an den zu untersuchenden Cytosinpositionen einzelsträngig vorliegen.
5. Verfahren nach dem Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die einzelsträngigen Bereiche zwischen 3 und 20 Nukleotide groß sind.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die einzelsträngigen Bereiche zwischen 5 und 12 Nukleotide groß sind.
- 5 7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der einzelsträngige Bereich 9 Nukleotide groß ist.
- 10 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere eine Länge von 20 bis 150 Nukleotide aufweisen.
- 15 9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere eine Länge von 35 bis 60 Nukleotide aufweisen.
- 20 10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere in einer Konzentration von 1 pM bis 1000 nM vorliegen.
- 25 11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere in einer Konzentration von 1 nM bis 100 nM vorliegen.
- 30 12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man die zu untersuchende DNA nach der enzymatischen Behandlung amplifiziert.
- 35 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels einer Polymerasereaktion erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels einer Polymerasekettenreaktion erfolgt.

- 5 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasekettenreaktion mittels methylierungsspezifischer Primer erfolgt.
- 10 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass in der Polymerasekettenreaktion mindestens ein methylierungsspezifisches Blocker-Oligomer eingesetzt wird.
- 15 17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Amplifikation eine erneute enzymatische Umsetzung mit einer Cytidin-Deaminase erfolgt.
- 20 18. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikate über Methoden der Längenmessung, der Massenspektrometrie oder der Sequenzierung analysiert.
- 25 19. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikate durch Primer-Extension-Verfahren analysiert.
- 30 20. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikate durch Hybridisierung an Oligomer-Arrays analysiert.
- 35 21. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikate unter Verwendung von Real-Time-Varianten analysiert.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Taqman oder ein Lightcycler-Verfahren durchführt.

23. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass man mehrere Fragmente gleichzeitig mittels einer Multiplex-Reaktion amplifiziert.
24. Verwendung eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1-23 zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten.
25. Verwendung eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 23 zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Unterscheidung von Zelltypen und Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
26. Verwendung von Cytidin-Deaminasen, die Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell umsetzen, zur Methylierungsanalyse.
27. Verwendung von Cytidin-Deaminasen, die Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell umsetzen, zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten
28. Verwendung von Cytidin-Deaminasen, die Cytidin und 5-Methylcytidin unterschiedlich schnell umsetzen, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Unterscheidung von Zelltypen und Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
29. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Cytidin-Deaminase um die Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase handelt.

din-Deaminase (AID), um ein biologisch aktives Fragment der AID bzw. eine Modifikation hiervon handelt.

- 5 30. Ein Kit, der aus dem AID-Enzym, einem biologisch aktiven Fragment der AID oder einer Modifikation hiervon sowie Oligomeren und den für die Deaminierung erforderlichen Puffern besteht, sowie optional auch eine Polymerase, Primer und Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält.
- 10

Sequenzprotokoll

Sequence listing

5 <110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA mittels
Cytidin-Deaminasen

10 <160> 5

<210> 1

<211> 340

<212> DNA

15 <213> Homo Sapiens

<400> 1

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| gaagaaagag | gaggggctgg | ctggtcacca | gaggggtggg | cggaccgcgt | gcgctcggcg | 60 |
| gctgcggaga | gggggagagc | aggcagcggg | cggcggggag | cagcatggag | ccggcggcgg | 120 |
| ggagcagcat | ggagccttcg | gctgactggc | tggccacggc | cgcggcccgg | ggtcgggtag | 180 |
| aggaggtgcg | ggcgctgctg | gaggcggggg | cgctgcccga | cgcaccgaat | agttacggtc | 240 |
| ggaggccgat | ccaggtgggt | agagggctctg | cagcgggagc | aggggatggc | gggcgactct | 300 |
| ggaggacgaa | gtttgcaggg | gaattggaat | caggtagcgc | | | 340 |

25 <210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

30 <400> 2

| | | | | | |
|-----------|------------|-----------|------------|---|----|
| ctccccccc | gcctgcgcgt | gcgctccgc | cgacgcctct | c | 41 |
|-----------|------------|-----------|------------|---|----|

35 <210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

40 <400> 3

| | | | | | |
|------------|-------------|------------|-----------|---|----|
| gccgactgac | cgacccccacg | gccgcccggg | ccccagccc | a | 41 |
|------------|-------------|------------|-----------|---|----|

45 <210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial

50 <400> 4

| | | |
|------------|---------|----|
| cgcctggcgc | acgcaaa | 17 |
|------------|---------|----|

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

55 <213> artificial

<400> 5

| | | | |
|------------|------------|---|----|
| ttacggtcgg | ggcccgggct | c | 21 |
|------------|------------|---|----|

60

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-Sequenzen.

5 Dabei wird die zu untersuchende DNA mit einer Cytidin-Deaminase umgesetzt, die Cytidin schneller als 5-Methylcytidin deaminiert. Durch die Umwandlung wird Cytosin in Uracil umwandelt, während 5-Methylcytosin im wesentlichen unverändert bleibt. Die enzymatisch vorbehandelte DNA wird bevorzugt amplifiziert und kann dann über
10 unterschiedlichen Methoden analysiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen und anderer mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierter Krankheiten sowie zur Prognose unerwünschter Arzneimittelwirkungen.
15